

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12P 21/08	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 91/00921 (43) Date de publication internationale: 24 janvier 1991 (24.01.91)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00517</p> <p>(22) Date de dépôt international: 6 juillet 1990 (06.07.90)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 8909220 7 juillet 1989 (07.07.89) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SOULILLOU, Jean-Paul [FR/FR]; 32 ter, rue de l'Abbaye, F-44100 Nantes (FR). CHATAL, Jean-François [FR/FR]; Faculté de Médecine, 1, rue Gaston-Veil, F-44035 Nantes Cédex (FR). THEDREZ, Philippe [FR/FR]; Faculté de Médecine, 1, rue Gaston Veil, F-44035 Nantes Cédex (FR). JACQUES, Yannick [FR/FR]; 32 bis, rue Noire, F-44000 Nantes (FR). PAINEAU, Jacques [FR/FR]; Faculté de Médecine, 1, rue Gaston Veil, F-44035 Nantes Cédex (FR).</p>	<p>(74) Mandataires: GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 67, boulevard Haussmann, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet européen), CH (brevet européen), DE (brevet européen)*, DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US.</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>	
<p>(54) Title: FRAGMENTS OF MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC TO THE PRESENCE OF ACTIVATED LEUCOCYTES, PROCESS FOR OBTAINING THEM AND THEIR APPLICATION IN THE CASE OF A TRANSPLANT BEING REJECTED</p> <p>(54) Titre: FRAGMENTS D'ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES DE LA PRESENCE DE LEUCOCYTES ACTIVES - LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET LEUR APPLICATION DANS LE CAS DE REJET DE GREFFE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Fragments of antibodies capable of attaching themselves to an antigenic site of a receptor present on the activated leucocytes. The invention particularly concerns the fragments of antibodies recognizing an antigenic site specific to the receptor of the IL-2. The invention also concerns the use of the antibody fragments to detect the rejection of a transplant, and their use in kits.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne des fragments d'anticorps capables de se fixer à un site antigénique d'un récepteur présent sur les leucocytes activés. Elle vise en particulier des fragments d'anticorps reconnaissant un site antigénique spécifique du récepteur de l'IL-2. L'invention concerne également l'utilisation de ces fragments d'anticorps pour la détection d'une crise de rejet de greffe, ainsi que leur application dans des kits.</p>		

DESIGNATIONS DE "DE"

Jusqu'à nouvel avis, toute désignation de "DE" dans toute demande internationale dont la date de dépôt international est antérieure au 3 octobre 1990 a effet dans le territoire de la République fédérale d'Allemagne à l'exception du territoire de l'ancienne République démocratique allemande.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	ES	Espagne	MC	Monaco
AU	Australie	FI	Finlande	MG	Madagascar
BB	Barbade	FR	France	ML	Mali
BE	Belgique	GA	Gabon	MR	Mauritanie
BF	Burkina Faso	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
BG	Bulgarie	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BJ	Bénin	HU	Hongrie	NO	Norvège
BR	Brésil	IT	Italie	PL	Pologne
CA	Canada	JP	Japon	RO	Roumanie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	LJ	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
DE	Allemagne	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DK	Danemark			TC	Togo
				US	Etats-Unis d'Amérique

FRAGMENTS D'ANTICORPS MONOCLONAUX SPECIFIQUES DE LA
PRESENCE DE LEUCOCYTES ACTIVES - LEUR PROCEDE
D'OBTENTION ET LEUR APPLICATION DANS LE CAS DE REJET
DE GREFFE.

5 L'invention concerne des fragments d'anticorps
monoclonaux, spécifiques de la présence de leucocytes
activés.

10 L'invention vise également un procédé d'obtention
de ces fragments d'anticorps ainsi que leur
application clinique en tant que marqueurs de la
présence de leucocytes activés notamment dans le cas
de rejet de greffe.

15 Les transplantations d'organes sont maintenant
utilisées dans le cas de certaines insuffisances. La
transplantation cardiaque est par exemple devenue un
traitement bien réglé de l'insuffisance cardiaque
terminale. Le taux élevé de survie des patients est
lié à l'utilisation de la cyclosporine associée à la
prednisone et l'azathioprine. Cependant le rejet des
20 allogreffes est souvent silencieux et son diagnostic
difficile. Les signes cliniques apparaissent
tardivement: ils peuvent se traduire par une asthénie,
un fébricule, une prise de poids, une oligurie.
L'examen est peu significatif (assourdissement des
25 bruits du coeur, galop, trouble du rythme). Avec la
cyclosporine l'examen est le plus souvent normal. A un
stade trop tardif apparaissent les signes
d'insuffisance cardiaque.

30 Les autres méthodes utilisables pour la
surveillance des greffés posent de façon générale le
problème de leur significativité, de leur sensibilité,
de leur spécificité, de leur accessibilité technique
et de leur coût (échographie, monitoring
cytoimmunologique, détermination du rapport OKT4/OKT8,
35

scintigraphies aux lymphocytes marqués à l'indium, etc...).

5 La biopsie endomyocardique ventriculaire droite reste l'élément utilisé dans la surveillance immunologique pour le diagnostic du rejet de greffe cardiaque mais il s'agit d'un examen invasif et contraignant pour le patient.

10 Les inventeurs ont recherché et mis au point de nouveaux moyens susceptibles d'être utilisés dans la recherche d'une crise de rejet de greffe ou d'un éventuel rejet de greffe et capables de remédier du moins en partie, aux problèmes ci-dessus mentionnés.

15 Dans le cadre de ces recherches, les inventeurs se sont intéressés à la biodistribution d'anticorps monoclonaux (AcM) en particulier d'anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de l'interleukine 2 ou certains de ses sites spécifiques (épitopes), lors d'une greffe d'organe. Ils ont également déterminé chez l'animal les quantités
20 d'anticorps monoclonaux présents quand ils sont injectés après une greffe, dans les différents organes du sujet receveur, y compris dans l'organe greffé.

25 Jusqu'à présent on connaissait la propriété de certains anticorps monoclonaux particuliers, de reconnaître le récepteur de l'interleukine-2 et de former avec ce récepteur un complexe immunologique.

Pour simplifier l'écriture dans la suite du texte "l'interleukine-2" sera parfois désignée par "Il-2" et
30 "le récepteur de l'interleukine-2" par "Il-2-R".

Des anticorps monoclonaux décrits dans l'art antérieur interagissent avec un domaine particulier du récepteur de l'Il-2 (dont l'expression est sous le contrôle de l'activation antigénique, due par exemple
35 à un organe greffé) de certains lymphocytes. Ce

domaine particulier correspond à l'un des épitopes constitutifs d'un site de haute affinité du récepteur de l'IL-2, constitué par un complexe formé des chaînes α (ou TAC) de 55 kDa et β de 75 kDa. De la réaction d'interaction des anticorps avec le domaine antigénique du récepteur de l'IL-2, peut résulter une inhibition de la croissance des clones de lymphocytes dirigés contre les antigènes du donneur lors d'une greffe hétérologue. In vivo, il devrait en résulter une inhibition du rejet de greffe.

Dans leur démarche les inventeurs ont envisagé une nouvelle approche des anticorps monoclonaux, notamment des anticorps dirigés contre des récepteurs spécifiquement présents sur les leucocytes, notamment les lymphocytes et/ou les monocytes, lorsque ceux-ci sont activés et plus particulièrement contre un épitope spécifique d'un site différent du site de haute affinité du récepteur de l'IL-2, dans les situations de greffe notamment hétérologue.

En poursuivant leurs travaux les inventeurs se sont intéressés plus particulièrement à des fragments spécifiques de ces anticorps monoclonaux. Ils ont mis en évidence la propriété particulière de fragments déterminés d'anticorps monoclonaux, de se fixer de façon spécifique et précoce, éventuellement quelques jours après la greffe, sur les cellules leucocytaires par exemple du type des monocytes ou des macrophages et en particulier de type lymphocytaires infiltrant un greffon d'un sujet susceptible de présenter une crise de rejet de greffe et donc susceptible de rejeter une greffe en particulier une greffe de type hétérologue.

En d'autres termes, les inventeurs ont mis en évidence que des fragments spécifiques d'anticorps monoclonaux déterminés peuvent se fixer sur un épitope

spécifiquement présent dans une situation d'activation des leucocytes chez le receveur d'une greffe.

Par contraste, les inventeurs ont montré que cette propriété des fragments d'anticorps n'apparaît pas lorsque la greffe réalisée n'est pas susceptible de rejet par exemple dans le cas de greffe de type syngénique.

L'invention fournit donc de nouveaux moyens utilisables pour révéler la présence de leucocytes activés. La détection des leucocytes activés peut s'avérer particulièrement intéressante à la suite d'une greffe d'organe, notamment d'une greffe de coeur ou de rein, ou d'une greffe de moelle osseuse (réaction du greffon contre l'hôte) ou autre tissu. Ces nouveaux moyens constituent un outil d'exploration particulièrement intéressant, susceptible d'être intégré dans un processus de diagnostic clinique d'un rejet de greffe en particulier chez l'homme.

L'invention concerne à cet effet des fragments d'anticorps monoclonaux, dirigés contre des récepteurs présents sur des cellules leucocytaires infiltrant un greffon, caractérisés par:

- l'absence de fraction constante (Fc),
- leur capacité à se fixer spécifiquement à l'épitope d'un site antigénique d'un récepteur des cellules leucocytaires infiltrant le greffon lors d'une crise de rejet de greffe.

La fixation des fragments d'anticorps de l'invention à l'épitope défini ci-dessus, a lieu in vivo.

Par greffon, on doit entendre à la fois les organes greffés ainsi que toute autre substance tissulaire ou non (telle que la moëlle osseuse).

Les inventeurs ont constaté que la fixation spécifique des fragments d'anticorps de l'invention

sur un épitope particulier d'un site antigénique d'un récepteur des cellules leucocytaires est une caractéristique particulièrement avantageuse dans le cadre de la détection d'une activation leucocytaire. L'utilisation d'anticorps entiers connus jusqu'à présent pour leur action sur les leucocytes pour bloquer des rejets de greffe ne permet pas d'obtenir la spécificité de fixation recherchée.

Selon un premier aspect de l'invention, des fragments répondant aux critères ci-dessus définis sont des fragments idiotypiques d'un anticorps, lesdits fragments idiotypiques possédant un site anticorps spécifique d'un épitope d'un site antigénique d'un récepteur humain déterminé, accessible au niveau d'un greffon, chez un patient présentant une crise de rejet de greffe.

Des fragments d'anticorps adaptés à la réalisation de l'invention sont des fragments idiotypiques, d'anticorps dirigés contre des récepteurs spécifiquement induits chez l'hôte ayant subi la greffe, à la suite de l'activation des leucocytes en particulier des lymphocytes et notamment des lymphocytes T par un antigène du greffon.

Ces fragments peuvent être les fragments d'anticorps monoclonaux dirigés contre des sites d'antigènes et notamment des sites antigéniques de récepteurs, avantageusement de récepteurs de lymphokines en particulier de différentes interleukines, notamment IL-2, IL-4, IL-5 ou de récepteurs de la transferrine, dès lors qu'ils présentent la spécificité voulue, c'est-à-dire lorsqu'ils sont présents sur des leucocytes ayant subi une activation par exemple en cas de crise de rejet de greffe.

Selon un aspect particulièrement préféré de l'invention, les fragments d'anticorps comprennent au moins un site anticorps présentant une affinité avec un épitope de la chaîne TAC du récepteur humain de l'Il-2. En effet on a noté qu'un déterminant d'activation leucocytaire particulièrement avantageux pour réaliser l'invention est le récepteur de l'Il-2.

La chaîne TAC (α ou P55) du récepteur de l'Il-2 est la chaîne présentant un poids moléculaire d'environ 55kDa. Seule, elle forme le site de faible affinité du récepteur de l'Il-2. Associée avec la chaîne β du récepteur, elle contribue à former le site de forte affinité.

Les inventeurs ont tiré profit du fait que la chaîne TAC est exprimée à la surface des leucocytes, uniquement lorsque ces leucocytes et en particulier les lymphocytes sont activés.

Elle se trouve alors en excès par rapport à la chaîne β avec laquelle elle contribue à la formation du site de haute affinité du récepteur de l'Il-2. L'excès de chaîne TAC reste alors disponible et constitue un site de faible affinité du récepteur de l'Il-2. Les inventeurs ont donc constaté que la chaîne TAC est suffisamment abondante et qu'elle ne possède pas une modulation trop rapide pour être utilisée dans le cadre de l'invention.

Cette modulation correspond à la réaction de l'antigène lorsqu'on lui accroche un anticorps, l'antigène tendant de rejeter cet anticorps.

Dans un premier mode de réalisation de l'invention, les fragments d'anticorps monoclonaux choisis, capables de reconnaître la chaîne TAC du récepteur humain de l'Il-2 sont les fragments $F(ab')_2$.

Ces fragments possèdent avantageusement l'ensemble des sites idiotypiques spécifiques de la

chaîne TAC, ce qui leur confère une affinité apparente importante vis-à-vis des récepteurs de l'I1-2 et permet d'obtenir des liaisons stables entre le fragment et le site du récepteur.

5 Dans un autre mode de réalisation de l'invention, les fragments d'anticorps monoclonaux sont des fragments Fab, capables de reconnaître la chaîne TAC du récepteur humain de l'I1-2.

10 Dans un autre mode de réalisation de l'invention, les fragments d'anticorps monoclonaux sont des fragments Fab', capables de reconnaître la chaîne TAC du récepteur humain de l'I1-2.

15 Les fragments d'anticorps répondant aux définitions précédentes sont obtenus à partir d'anticorps entiers, dirigés contre l'I1-2-R par exemple d'anticorps monoclonaux d'animaux par exemple de rat ou de souris; un exemple de procédé pour les préparer est décrit dans la suite.

20 Ils peuvent également être préparés à partir d'anticorps monoclonaux humains.

25 Les fragments peuvent aussi être obtenus à partir d'anticorps monoclonaux humanisés (ou anticorps chimères) possédant une partie animale correspondant au site anticorps caractéristique de l'antigène visé et une partie humaine correspondant aux autres parties de l'anticorps à savoir la fraction constante et éventuellement une partie de la fraction variable, excepté celle qui correspond au site anticorps reconnaissant l'antigène.

30 Ces fragments pourront également être constitués par des fragments synthétiques, présentant des propriétés d'interaction spécifiques avec les récepteurs visés et pouvant être mis en oeuvre pour répondre au problème ci-dessus.

L'invention vise également des fragments d'anticorps répondant aux définitions ci-dessus caractérisés en ce qu'ils sont marqués avec une substance physiologiquement acceptable, compatible avec l'administration chez l'homme ou l'animal, capable de donner un signal mesurable à l'extérieur du corps humain, notamment au moyen d'un appareil de comptage de la radioactivité. Des marqueurs particuliers satisfaisants sont par exemple des marqueurs radioactifs.

Les autres qualités requises pour qu'une substance puisse être utilisée en tant que marqueur dans le cadre de l'invention, éventuellement après modification chimique, sont par exemple, la stabilité de la liaison entre le marqueur et le fragment d'anticorps mis en oeuvre, la rapidité de la cinétique dans le cas où le greffon (constituant la cible) doit être atteint rapidement, la faiblesse du bruit de fond lors du test au niveau du sujet greffé. Ces qualités doivent naturellement être modulées selon la nature de l'organe ou de la substance greffée. Tous les paramètres cités ci-dessus ne seront donc pas nécessairement considérés, et ce d'autant plus que des corrections peuvent être apportées par des systèmes externes.

Un marqueur particulièrement adapté à la réalisation de l'invention est le technetium notamment le technetium 99, de préférence sa forme métastable.

Il peut être utilisé en marquage direct par couplage sur les fragments $F(ab')$ ou par marquage indirect, selon la stabilité désirée, par exemple sur des fragments $F(ab')_2$. Dans ce cas, pour pallier l'absence de groupements sulfhydrile libres sur le fragment $F(ab')_2$ on met en oeuvre un réactif capable

de complexer le technetium et susceptible d'être facilement couplé aux fragments $F(ab')_2$.

5 D'autres marqueurs radioactifs satisfaisants pour la réalisation de l'invention sont par exemple l'indium et notamment l'indium111 ou l'iode et en particulier l'iode131 (^{131}I), l'iode125 (^{125}I) et l'iode 123 (^{123}I).

10 Ces marqueurs radioactifs sont intéressants dans le cas où les mesures de radioactivité faites à la suite de l'exploration au niveau du malade, dans le cas du diagnostic d'un éventuel rejet de greffe, sont réalisées au moyen d'une gamma-scintigraphie.

15 L'invention concerne donc un procédé pour le marquage de fragments d'anticorps déterminés par une substance radioactive choisie, comprenant les étapes suivantes :

- 20 - mise en contact des fragments d'anticorps que l'on veut marquer, avec un réactif capable de former un complexe stable avec le marqueur et susceptible d'être couplé aux fragments d'anticorps, dans des conditions permettant ce couplage et,
- complexation des fragments ainsi couplés avec le marqueur.

25 Selon une variante de ce procédé de marquage, l'étape de complexation du réactif avec le marqueur, précède l'étape de couplage avec les fragments d'anticorps. Cette variante peut par exemple être avantageusement utilisée lorsque l'on souhaite effectuer un marquage avec le technetium.

30 Selon une autre variante du procédé de marquage, une étape de purification, par exemple par filtration sur gel, peut précéder la récupération des fragments d'anticorps.

35 Un mode de réalisation avantageux du marquage au technetium met en oeuvre du technetium réduit (par

exemple par réaction de l'ion stanneux sur la forme pertechnétate TcO_4^-) puis complexé avec un agent chélatant faible par exemple un agent de type pyrophosphate di-, tri- ou tétraphosphonate (A Bardy, brevet FR 7427249) ou des composés IDA (iminodiacétique).

L'agent chélatant est ensuite échangé par l'anticorps, ligand plus fort. Les atomes ^{99m}Tc réduits se lient directement aux groupements donneurs de l'anticorps par des sites de faible affinité, forte capacité (groupements amino, carboxylate...), et par des sites de forte affinité, faible capacité (groupements sulfhydrile). Cette deuxième forme des complexes est très stable in-vivo et constitue un mode de réalisation préféré.

A titre d'exemple, un procédé de marquage de fragments Fab' d'anticorps avec le technetium peut être réalisé comme suit:

- mise en contact de fragments Fab' d'anticorps avec un agent chélatant faible du type évoqué ci-dessus, dans un tampon, par exemple un tampon phosphate-EDTA, dans une solution physiologique de sel de sodium à un pH appartenant à un intervalle 5 à 8, de préférence à un pH 6,0 et à température ambiante,
- addition de TcO_4^- dans des proportions de 1 à 30 mCi dans des conditions autorisant le marquage.

Lorsque les fragments d'anticorps ne peuvent être directement liés au technetium, par exemple en l'absence de groupements sulfhydrile libres, l'étape de mise en contact ci-dessus peut être réalisée en utilisant un réactif capable de complexer fortement le technetium et susceptible d'être facilement couplé aux fragments d'anticorps. Peuvent être utilisés comme réactifs, des acides polyaminocharboxyliques, par exemple l'acide diéthylènetriaminepentaacétique

(DTPA), des analogues de l'acide éthylenetriaminatetraacétique (EDTA), des composés diaminodithiols, triaminothiols (ex : les (thioacétamide/ pentanoile) des amines polycycliques des dithiosemicarbozones et des métallothionines ou des anhydrides de ces acides, notamment des anhydrides cycliques. Ces agents chélatants sont préparés par des méthodes connues. Pour le marquage au technetium, on pourra par exemple se référer à la publication Eckelman et al Nucl, Med. Bid. vol16 n° 2, pp 171-176, 1989.

Pour effectuer le marquage à l'indium 111 on peut utiliser un agent chélatant bifonctionnel couplé aux fragments d'anticorps, qui va ensuite complexer fortement l'indium.

Pour le couplage à l'anticorps, le DTPA peut être activé sans la forme d'anhydride bicyclique, d'anhydride mixte (DTPA-isobutylchloroformate) de chlorure d'acide ou, les formes suivantes peuvent être synthétisées SCN-benzyl DTPA, $B_2(CH_2)_n$ benzyl DTPA (avec $n=2, 3, 4$) N_2 - benzyl DTPA.

A titre d'exemple, un procédé de marquage de fragments Fab' ou $F(ab')_2$ avec l'indium peut être réalisé comme suit :

- mise en contact des fragments d'anticorps en solution avec un agent chélatant déterminé, par exemple l'anhydride bicyclique de DTPA solubilisé dans un rapport molaire agent chélatant/fragment 2 à 10, de préférence de 5,0 ,
- puis l'élimination de l'agent chélatant n'ayant pas complexé les fragments d'anticorps,
- mise en contact des fragments complexés avec l'indium dans une solution tamponnée à pH 4 à 6, de préférence à pH 5,0 dans des conditions autorisant le marquage.,

Pour les techniques de marquage on pourra, de façon générale, se référer aux publications suivantes : Childs et al (J Nucl Med 26 : 293-299, 1985), Hosotani et al (Nucl Med Biol vol 13 n° 6 pp 603-609, 1986), Fritzberg et al (PNAC USA vol 85 pp 4025-4029, Juin 88), Brown et al (Analytical Biochemistry 172, 22-28, 1988). On pourra également se référer à la demande de brevet EP 0263046 du 16 septembre 1987 (priorité FR 8613146).

Entrent également dans le cadre de l'invention, des compositions caractérisées en ce qu'elles ont la capacité d'induire la formation de complexes du type antigène-anticorps chez un patient présentant des leucocytes activés pouvant marquer un risque de rejet de greffe, en ce qu'elles sont dépourvues de cette capacité chez un patient ayant subi une greffe et ne subissant pas de rejet au moment de l'examen et, en ce qu'elles comprennent des fragments d'anticorps tels que décrit ci-dessus.

Une composition préférée répondant à la définition précédente est capable d'induire la formation de complexes du type antigène-anticorps en présence de leucocytes activés du receveur de la greffe, ces leucocytes étant porteurs de chaînes TAC du récepteur humain de l'Il-2.

Etant donné leurs propriétés caractéristiques, les fragments précédemment définis ainsi que les compositions décrites peuvent entrer dans la composition d'un réactif dépourvu de toxicité pour l'homme, pour la mise en évidence de la présence de leucocytes activés, chez un patient susceptible de présenter un rejet de greffe, ces fragments étant marqués par un marqueur compatible avec l'administration chez l'homme et répondant aux critères ci-dessus. Ce réactif peut être utilisé dans

le cas de différentes greffes telles que des greffes de coeur, de rein, de moelle.

5 L'inocuité du réactif est déterminée en fonction des critères classiquement utilisés: il doit notamment être apyrétique, non cancérigène, contenir moins de 10% d'ADN étranger, être non pyrogène, stérile, dépourvu de micro-organismes et autres agents étrangers.

10 Le réactif ci-dessus peut être appliqué pour détecter chez l'homme ou l'animal la présence de leucocytes activés en particulier de lymphocytes activés, par différentes méthodes de mesure par gamma scintigraphie.

15 Une première méthode préférée pour la détection de lymphocytes activés est l'immunoscintigraphie en particulier la gamma-immunoscintigraphie.

20 A cet égard l'invention concerne une méthode d'exploration non sanglante applicable chez l'homme ayant subi une greffe, pour rechercher la présence de leucocytes activés, cette présence étant susceptible d'être ultérieurement corrélée avec un rejet de greffe, comprenant la détermination de la présence de leucocytes activés chez un sujet greffé au moyen d'un support extérieur au corps du sujet, le sujet ayant
25 reçu au préalable des fragments d'anticorps ci-dessus décrits, préalablement marqués si besoin, ou la composition dont les fragments ont été préalablement marqués ou le réactif décrit ci-dessus, caractérisé en ce que les fragments d'anticorps, cette composition ou
30 ce réactif sont administrés en quantité suffisante pour permettre une réaction avec la chaîne TAC du récepteur de l'Il-2, lesdits fragments étant marqués avec une substance physiologiquement acceptable, capable de donner un signal mesurable à l'extérieur du
35

corps humain, notamment au moyen d'un appareil de comptage de la radioactivité,

5 L'application du procédé précédent permet d'obtenir des images en scintigraphie représentant la quantité de fragments d'anticorps liés aux chaînes des récepteurs visés sur les leucocytes infiltrant le greffon.

10 D'autres étapes consistant dans la mesure de la radioactivité du marqueur obtenue ainsi que la comparaison de cette mesure, avec des données caractéristiques d'un état d'absence de rejet de greffe, peuvent permettre de détecter un niveau anormal d'activation des leucocytes notamment des lymphocytes et conduire au diagnostic d'une
15 éventualité de rejet de greffe.

La méthode d'exploration ci-dessus présente l'avantage tout à fait intéressant de pouvoir être appliquée à des situations cliniques, de façon
20 précoce.

Elle est notamment utile pour la surveillance de patients ayant subi une greffe hétérologue.

Cette méthode présente également l'avantage d'être non traumatisante pour le patient.

25 L'invention concerne également un procédé d'obtention de fragments d'anticorps monoclonaux répondant aux définitions ci-dessus comprenant les étapes suivantes :

- purification d'anticorps monoclonaux dont on souhaite obtenir lesdits fragments,
 - 30 - digestion par une ou plusieurs enzymes protéolytiques déterminées, choisies en fonction de la nature des fragments anticorps recherchés, dans des conditions autorisant la coupure desdits fragments du reste des anticorps,
- 35

15

- isolement et récupération des fragments d'anticorps obtenus.

A titre d'exemple un procédé de préparation de $F(ab')_2$ peut être réalisé comme suit :

5

- purification d'anticorps monoclonaux dont on souhaite obtenir lesdits fragments,

10

- digestion par une ou plusieurs enzymes protéolytiques déterminées, par exemple la pepsine, dans des conditions autorisant la coupure desdits fragments du reste des anticorps, notamment à une température de $37^{\circ}\text{C} \pm 10$ en présence de 0,5 à 10%, de préférence 1 à 5% de pepsine à pH acide notamment entre 3,4 et 5, avantageusement entre 3,2 et 4,5,

15

- isolement et récupération des fragments d'anticorps obtenus.

Pour le marquage avec la pepsine, on pourra se référer à la publication Lamoyi (J. Immunol Meth, 1983 vol. 56, p 235-243).

20

Dans un autre mode de réalisation du procédé de l'invention, la digestion est par exemple réalisée à l'aide de papaine et elle conduit à des fragments Fab.

25

Pour préparer les fragments Fab, on peut par exemple suivre le protocole précédent en modifiant les conditions opératoires : le pH de la réaction est de préférence basique (de préférence 7,8), on opère avantageusement en présence de NaCl et d'un agent réducteur, par exemple la cystéine 0,1 M. La réaction peut être faite pendant 2 à 4 h.

30

L'invention concerne également un kit pour l'exploration chez un patient ayant subi une greffe, de la présence de leucocytes activés, caractérisé en ce qu'il comprend:

35

- des fragments d'anticorps tels que définis précédemment,

- un marqueur physiologiquement acceptable, capable de donner un signal mesurable à l'extérieur du corps humain, notamment au moyen d'un appareil de comptage de la radioactivité,

5 - le cas échéant un réactif autorisant la liaison entre le fragment d'anticorps et le marqueur, ou stabilisant cette liaison.

10 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans les exemples et les figures qui suivent.

Figure 1: biodistribution d'anticorps monoclonaux intacts ^{125}I OX39 et ^{131}I B1G6 chez des animaux ayant reçu une greffe allogénique. Les mesures ont été
15 faites 5 jours après la transplantation et 24 heures après l'injection intraveineuse d'anticorps.

Figure 2: Biodistribution de fragments F(ab')_2 de l'anticorps OX39 dirigé contre le récepteur de l'I12 et d'un anticorps B1G6 utilisé en tant que contrôle,
20 24 heures après l'injection. La radioactivité du coeur greffé et du coeur d'origine a été mesurée 5 jours après une greffe de coeur allogénique et hétérotopique (LEW/BN) chez des animaux de type LEW, ou une greffe de coeur syngénique chez des animaux de première
25 génération (F1) de type (LEW/BN). Les résultats sont exprimés en pourcentage de doses injectées par gramme.

Figure 3: Résultats des études de la biodistribution de fragments F(ab')_2 de l'anticorps monoclonal OX39 et de fragments F(ab')_2 de l'anticorps B1G6 chez des
30 receveurs de greffes hétérotopiques du type allogénique ou syngénique. La radioactivité a été mesurée de 7 à 24 heures après l'injection intraveineuse des fragments d'anticorps.

Figure 4: Immunoscintigraphie chez des rats de
35 l'espèce LEW, 4 jours après une transplantation

hétérotopique soit syngénique ou allogénique d'un organe d'un animal de première génération (F_1) résultant d'un croisement LEW/BN ((LEW/BN) F_1) et 24 heures après une injection intraveineuse de fragments $F(ab')_2$ ^{131}I OX39. Le temps d'acquisition des données était de 10 minutes pour chaque image chez des receveurs préalablement anesthésiés. Tous les animaux ont ensuite été sacrifiés pour les études de biodistribution. Les études en imagerie et les études de biodistribution ont été faites sur des receveurs différents.

A/ Chez des receveurs de type LEW, de transplantation hétérotopique d'organe obtenu chez un animal du type LEW/BN) F_1 , le coeur rejeté a pu clairement être visualisé (voir la flèche). Les deux autres taches correspondent à la thyroïde (tache supérieure) et aux voies urinaires.

B/ Dans le cas d'une transplantation orthotopique de type syngénique (LEW/LEW) le coeur transplanté n'était pas visualisé alors que la radioactivité au niveau de la thyroïde subsistait. Aucune radioactivité de la vessie n'a été notée, ce qui correspond probablement à une miction.

C/ Dans des combinaisons de type (LEW/BN) F_1 , LEW, ayant reçu une injection de fragments ^{131}I -B1G6 $F(ab')_2$, la radioactivité de la thyroïde avait diminué de façon inexplicable par rapport au texte réalisé dans les cas A et B, bien qu'il n'y ait aucune visualisation de l'allogreffe hétérotipique.

Figure 5: Tableau 1: Les rapports de la radioactivité d'un coeur allogène greffé par rapport au tissu du receveur sont donnés pour des fragments $F(ab')_2$ de l'anticorps ^{131}I OX39 ou de l'anticorps B1G6, 7 heures et 24 heures après l'injection de la substance radioactive chez 4 animaux différents. Des fragments

F(ab')₂ dirigés contre le récepteur de l'IL₂ se sont accumulés de façon spécifique dans le greffon rejeté alors que ce n'est pas le cas dans le propre coeur du receveur.

5

EXEMPLE 1MATERIEL ET METHODE1/ Transplantation

10

Des allogreffes de coeur éterotopiques ont été réalisées selon la méthode Ono et al (J.Thorac-cardiovasc-Surg 1987; 57:225) dans des rats d'espèce LEWIS et d'espèce (LEW/BN)F₁ (Soulillou JP et al. Transplantation 1988; 38:63). Des greffes syngéniques de contrôle de type LEW-LEW ont également été

15

utilisées comme témoins. Les battements du coeur greffé ont été suivis chaque jour et seuls les receveurs présentant une bonne fonction du greffon à différents moments d'une injection avec un anticorps monoclonal ont été utilisés.

20

2/ Anticorps monoclonaux

25

OX39 est un anticorps monoclonal de souris de la classe des IgG1 dirigé contre la chaîne TAC (55Kd) du récepteur de l'Interleukine-2 du rat et qui reconnaît cette chaîne avec une affinité de 2nM. Il a été décrit dans l'article "Transplant. International" (1988, 1:58-63). Il n'interagit pas avec la chaîne β et ne modifie pas la réponse immune du receveur sur le greffon car dans ce cas particulier, il ne bloque pas l'interaction de l'IL₂ sur le récepteur en

30

conformation dite de "haute affinité" (association $\alpha\beta$).

35

Un anticorps monoclonal de souris spécifique de la microglobuline B₂ humaine (B₁G₆), obtenu auprès de Immunotech, Luminy France a été utilisé comme anticorps monoclonal témoin non spécifique, IgG₁ de

souris. Les anticorps monoclonaux ont été obtenus à partir d'ascites induits par des hybridomes, les hybridomes étant eux-mêmes obtenus de PHLS Center for Applied Microbiology and Research (Division de Biology) Porton Down, Falisbury (UK), pour OX39. Ces anticorps ont été purifiés sur une colonne Affigel Protéine A. Les fragments respectifs $F(ab')_2$ de ces deux anticorps monoclonaux ont été préparés par digestion avec la pepsine. Les anticorps monoclonaux ont été dialysés pendant une nuit contre un tampon d'acétate 0,05M, à pH 3,8 puis ont été digérés avec la pepsine (Cooper Biomédical) 1% (w/w) pendant 5 heures à 37°C. La réaction a été stopée par addition de tampon Tris 2,5M pour obtenir un pH 8. Les fragments $F(ab')_2$ ont été isolés sur Sephadex G150 (Pharmacia) et sur Protéine A Sépharose (Pharmacia). Les fractions $F(ab')_2$ présentaient un degré de pureté de 95 à 98% après électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS.

3/ Marquage

Les anticorps intacts et les fragments $F(ab')_2$ ont été marqués avec ^{131}I ou ^{125}I . L'iodation a été réalisée en utilisant la méthode iodogène décrite par Fraker (PJ et al. Biochem Biophys Res Commun 1978 ; 80:849 conduisant à une activité spécifique de 5 $\mu Ci/\mu g$ d'anticorps. En résumé, une partie aliquote (50 μl) de solution de chlorure de méthylène contenant 10 μg de iodogène (Pierce) a été évaporée totalement dans un tube test. L'iode, mélangée avec différentes quantités d'anticorps a été ajoutée au tube et la réaction a été conduite pendant 10 minutes à 0-2°C. La protéine marquée a ensuite immédiatement été purifiée par chromatographie sur colonne de verre Biogel 2 (Biorad) et éluée avec un tampon phosphate salin (PBS) contenant 0,3% de sérum albumine bovine.

4/ Biodistribution des anticorps monoclonaux marqués à l'aide d'un marqueur radioactif chez les rats porteurs de greffe.

Les rats ont reçu différentes quantités d'anticorps monoclonal marqué (20-100-300 μ g/rat) d'activité spécifique déterminée, 4 ou 5 jours après la transplantation cardiaque hétérotopique. Une injection intraveineuse de ^{125}I -OX39 et ^{131}I -B₁G₆ a été faite avec une solution de 0,2ml d'anticorps monoclonal dans le PBS. Les rats ont été sacrifiés par dislocation cervicale à différents intervalles de temps après l'injection intraveineuse. Tous les organes et le coeur greffé du récepteur ont été prélevés immédiatement, lavés et pesés. La radioactivité (CPM/gramme) de chaque isotope a été déterminée en utilisant un compteur gamma à plusieurs canaux permettant l'enregistrement simultané de l'émission ^{131}I et ^{125}I . Les résultats sont exprimés en pourcentage de doses injectées par gramme de tissu. Pour chaque point, une moyenne des valeurs obtenues à partir de 3 rats a été prise en considération et les résultats sont donnés par valeur \pm SD (Standard Deviation) pour chaque groupe d'animaux. Le rapport spécifique d'anticorps monoclonal OX39 par rapport à l'anticorps monoclonal B₁G₆ a été estimé par la mesure de l'index de localisation (tissu $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$: sang $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$) tel que l'ont décrit Moshakis et al (Br J.Cancer 1981 ; 43:475).

Lorsque des fragments F(ab')₂ ont été utilisés l'index de localisation a été calculé en utilisant les rapports allogreffe/coeur et allogreffe/autre organes pour chaque rat ayant reçu des fragments F(ab').

5/ Gamma-scintigraphie

Pour les études de l'image, 100 μ g de fragments ^{131}I F(ab')₂ d'anticorps monoclonaux (activité

spécifique $5\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) ont été injectés aux receveurs d'allogreffe. La fonction thyroïdienne n'a pas été bloquée par l'iode froide. Les rats ont été anesthésiés et placés sous un colimateur. Les images ont ensuite été obtenues (10 minutes de scanner) en utilisant une caméra à scintillation à large champ (Searle Siemens, LFOV) avec un colimateur à trou d'énergie parallèle, avec un interface avec un ordinateur (SIMIS III, SOPHA MEDICAL).

RESULTATS

1/ Biodistribution d'anticorps OX39 marqués, intacts

Au cours d'expériences préliminaires, on a déterminé quelle était la dose la plus favorable en utilisant différentes doses d'anticorps marqués ($30-100-300 \mu\text{g}/\text{rat}$) testées pendant 24 heures après injection intraveineuse d'anticorps monoclonal. On a ensuite choisi d'utiliser une dose de $100\mu\text{g}/\text{rat}$ avec une activité spécifique de $5\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. De plus les schémas de biodistribution des anticorps monoclonaux mis en évidence lorsque les tissus étaient étudiés pendant 24 à 48 heures après l'injection d'anticorps monoclonaux étaient relativement similaires. Les analyses faites 72 heures après injection des F(ab')_2 apportaient moins d'information.

La figure 1 montre la biodistribution de $100\mu\text{g}$ d'anticorps monoclonal $^{125}\text{I-OX39}$ ($5\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) mesurée dans le sang et dans plusieurs tissus du receveur 24 heures après l'injection intraveineuse d'anticorps monoclonaux et 5 jours après la transplantation. Le pourcentage d'anticorps $^{125}\text{I-OX39}$ concentrés dans l'allogreffe constituait environ 0,6% de la radioactivité totale injectée. Bien que l'activité soit plus haute dans le greffon que dans les autres

tissus et le coeur propre au receveur, la distribution des valeurs n'était pas significativement différente de celle obtenue avec l'anticorps non spécifique ^{131}I -B₁G₆. La radioactivité des poumons était comparable à celle du greffon rejeté alors que le foie, la rate et les intestins présentaient des valeurs intermédiaires.

Une dose faible a été trouvée dans les muscles, le cerveau et les os. La radioactivité des reins résultait probablement d'une concentration au niveau du tissu et d'une filtration des anticorps ^{125}I -OX39 dégradée. Exprimés sous forme d'index de localisation de spécificité (LI comme indiqué dans Matériel et Méthode) qui ont pris la radioactivité du sang en compte, les résultats montrent une faible discrimination de ^{125}I -OX39 comparés aux anticorps non spécifiques pour l'organe rejeté (LI: $1,25 \pm 0,2$). Ces données suggèrent que la majorité des anticorps monoclonaux anti IL2 a été captée par les tissus riches en macrophages et/ou complexée par la forme soluble des récepteurs de l'IL2. Le taux de radioactivité du coeur (coeur allogreffé/coeur du receveur) (figure 1) déterminé avec à la fois OX39 et B1G6 (respectivement 1,95 et 1,12) suggère qu'il y a eu une forte affluence des cellules portant le récepteur pour la partie Fc de l'anticorps et le récepteur pour le complément dans le greffon dès le quatrième jour après la transplantation.

2/ Biodistribution des fragments F(ab')₂

La figure 2 montre la distribution de fragments ^{125}I -OX39 et ^{131}I B1G6 dans le greffon et dans le coeur de receveurs ayant subi une greffe allogénique ou une greffe syngénique 24 heures après l'injection. Dans ces expériences, 100 μg (5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) de fragments F(ab')₂ ont été injectés dans des rats séparés et la biodistribution a été étudiée 7 et 24 heures après

l'injection des produits marqués. Par contraste avec ce qui a pu être observé en utilisant des molécules intactes (figure 1), les fragments OX39 F(ab')₂ se sont accumulés de façon significative dans le greffon rejeté des receveurs d'allogreffes, alors que la radioactivité trouvée en cas de greffe syngénique n'était pas différente de celle du coeur propre au receveur. Les fragments F(ab')₂ de B1G6 ont présenté à peu près la même liaison dans le cas des coeurs de receveurs de greffes orthotopiques et hétérotopiques (allogéniques) (figure 2).

La figure 3 montre que les niveaux d'activité spécifique des tissus, mesurés chez les animaux ayant reçu une injection de fragments F(ab')₂ étaient beaucoup plus faibles que ceux obtenus avec des anticorps monoclonaux intacts. De plus, le rapport de la radioactivité greffon sur celle du poumon du foie ou de la rate augmentait de façon marquée pour les fragments F(ab')₂ de OX39, ce qui indique probablement une captation par l'intermédiaire des récepteurs des fragments Fc. Le tableau 1 (Figure 5) donne les taux de radioactivité du coeur allogreffé par rapport au coeur du receveur ou d'autres tissus du receveur, obtenus 7 et 24 heures après l'injection des fragments F(ab')₂, indiquant préférentiellement la localisation des produits anti IL2-R dans l'organe rejeté comparé au propre coeur du receveur.

3/ Gamma immuno-scintigraphie: Compte tenu des différentes quantités de radioactivité accumulées dans le propre coeur de l'animal et dans l'organe greffé allogénique rejeté, on a cherché à visualiser par immunoscintigraphie l'accumulation des cellules dans le greffon présentant des récepteurs pour l'IL2. Pour ces expériences, les fragments F(ab')₂ de OX39 et B₁G₆ ont été marqués avec ¹³¹I et injectés dans des animaux

différents indépendamment des expériences de biodistribution. La scintigraphie a été réalisée sur des rats anesthésiés 3, 4 et 5 jours après la transplantation de receveur de type LEW avec soit un coeur allogénique (LEW/BN) F_1 ou syngénique (LEW). La figure 4 montre que 24 heures après l'injection de fragments $F(ab')_2$ de ^{131}I -OX39, un signal net peut être obtenu chez le receveur d'une allogreffe (dès le 4ème jour après la transplantation) alors que seul un très faible signal peut être visualisé chez les receveurs de greffes syngéniques ou chez les receveurs de greffes allogéniques recevant des fragments $F(ab')_2$ non spécifiques.

DISCUSSION

Ces résultats mettent en évidence que de faibles quantités de OX39 marqués sont localisées dans le greffon lorsque l'anticorps est injecté 5 jours après la transplantation, au moment où le rejet d'une greffe allogénique est susceptible de se produire, lorsqu'il n'y a pas de lésions vasculaires endommageant la vascularisation du greffon. Etant donné que OX39 est faiblement efficace dans l'inhibition de la croissance des lymphocytes T, il n'interfère probablement pas avec la localisation et les quantités de cellules positives pour les récepteurs d'IL2 chez le receveur pendant la période de 24 heures suivant l'injection. De façon tout à fait intéressante dans cette série d'expériences, la biodistribution d'anticorps monoclonaux de contrôle (IgG₁) était pratiquement similaire pour ce qui concerne la distribution à celui de OX39, même au niveau du greffon. En revanche le propre coeur du receveur montrait une radioactivité beaucoup plus faible.

Ceci suggère que la majorité des anticorps monoclonaux intacts se lie au greffon rejeté par leurs

segments monomorphiques Fc. Cette liaison était probablement due aux macropages qui infiltraient le greffon pendant le rejet. Les profils de distribution n'ont pas subi de variations en fonction de la dose
5 d'anticorps monoclonaux marqués mais la radioactivité spécifique du greffon était maximale 24 heures après l'injection et déclinait après. Par contraste, les fragments F(ab')₂ OX39 ont été liés spécifiquement uniquement sur le coeur allogénique alors que les
10 fragments F(ab')₂ contrôles présentaient un schéma de distribution similaire dans les greffons allogéniques et syngéniques.

On a donc mis en évidence que dans la situation d'une greffe allogénique, la majorité des fragments
15 marqués est liée aux cellules circulantes présentant des récepteurs à l'IL2 dans la mesure où seule une faible fraction des fragments radioactifs sont retrouvés dans le rein. Ces lymphocytes activés hors de greffon représentent seulement une petite fraction
20 de l'ensemble des lymphocytes mais qui correspond néanmoins à un grand nombre de lymphocytes cibles. Cette liaison hors du greffon cardiaque peut jouer un rôle dans l'effet biologique des anticorps anti-récepteurs de l'IL2. Ils peuvent en particulier
25 interférer avec les cellules activées dirigées contre le donneur, cellules recirculantes du greffon vers les ganglions lymphatiques, la rate et vice-versa. Les cellules activées circulantes peuvent également compter pour une fraction de la localisation des
30 fragments F(ab')₂ dans d'autres organes tels que la rate, le foie et les poumons. De plus, la forme soluble des récepteurs de l'IL₂ est également capable de se lier aux anticorps monoclonaux anti IL2-R. Il est possible que son augmentation pendant le rejet
35 augmente la fraction complexée des fragments F(ab')₂

de OX39 à l'extérieur du greffon. Une analyse en immunoscintigraphie a montré qu'après l'injection de fragments $F(ab')_2$ de OX39 marqués avec ^{131}I , la fraction d'anticorps se liant aux cellules présentant des récepteurs de l'IL2 et infiltrant la greffe, pouvait être mesurée et visualisée par cette méthode. Conformément au résultat de la biodistribution obtenus avec des fragments $F(ab')_2$ anti IL2-R, l'image obtenue en gamma-scintigraphie était uniquement positive dans le cas de combinaison allogénique et non dans le cas de combinaison syngénique. De façon tout à fait intéressante, l'image obtenue dans le cas d'une greffe allogénique était facilement détectable dès le 4ème jour après la transplantation, ce qui représente un stade précoce de rejet et correspond à un moment où probablement moins de 20% des cellules infiltrant la greffe présentent des récepteurs d'IL2.

Lorsque cette méthode est appliquée à l'homme, l'interférence possible d'autres paramètres liés à la situation clinique tel qu'un traitement à la cyclosporine (CyA) qui peut diminuer la transcription des gènes du récepteur de l'IL2 ainsi que la concentration de lymphocytes dans l'organe rejeté doit être pris en compte. Le volume de tissus environnants peut également jouer un rôle dans la facilité de l'enregistrement.

EXEMPLE 2

PROTOCOLE APPLICABLE CHEZ UN PATIENT AYANT SUBI UNE GREFFE POUR RECHERCHER LA PRESENCE DE LEUCOCYTES ACTIVES

L'anticorps utilisé dans cette étude est l'anticorps 33B3.1 commercialisé par Immunotech sous la référence 317 et décrit par le Mauff et al (Hum. Immunology, 1987, 19, 53-68) et par Olive et al, 1986 (Eur Journal of Immunology n° 10 p. 611-616).

Les fragments Fab de cet anticorps est marqué au technetium 99m.

5 Ces fragments Fab sont marqués par addition d'une solution stérile apyrogène de marqueur radioactif. Une chromatographie sur papier du produit marqué est effectuée avant l'injection pour déterminer la pureté radiochimique. Le pourcentage obtenu doit être supérieur à 90% pour que le produit soit injecté.

10 1/ Population

Les patients sont des greffés cardiaques ayant subi une greffe au moins 10 jours auparavant et donc sortis du secteur stérile.

2/ Imagerie

15 Il est prévu 4 scintigraphies, (et éventuellement d'autres) couplées à des biopsies dans les périodes de haut risque de rejet: 15, 30, 45 et 60 jours après la transplantation. A la seconde injection, ces scintigraphies sont faites systématiquement après contrôle de l'absence d'anticorps anti-Fab'-33B3.1.

20 L'interprétation est effectuée par des observateurs.

Les critères de positivité sont définis par la localisation myocardique et l'intensité de fixation à l'aide d'un comptage par rapport à un échantillon.

25 3/ Toxicité

Des réactions anaphylactiques sont toujours possibles quand des anticorps sont injectés. Elles impliquent la disponibilité de mesures de réanimation.

30 Les examens de laboratoires sont effectués avant et 24 heures après l'injection:

- paramètres hématologiques: hémoglobine, hématocrite, globules rouges, globules blancs (PN, PEO, B, Ly), plaquettes.

35 - ionogramme sanguin: sodium, potassium, chlore, protides, calcium, glucose, créatinine, urée.

L'irradiation reçue par chaque patient est d'environ 250mRad pour chaque injection.

4/ Paramètres à considérer

5 Les mesures obtenues devront prendre en compte de l'importance de la population lymphocytaire au sein du greffon. En effet chez le rat non traité à J+4 de la greffe, 10% à 25% des cellules infiltrant le greffon sont R-IL2+. Chez l'homme ce taux serait de 7% (+/- 8) en sachant que la cyclosporine A diminuerait de 50%
10 l'expression du récepteur.

EXEMPLE 3

MARQUAGE DE FRAGMENTS Fab' DE L'ANTICORPS 3BB3.1 AVEC LE TECHNETIUM99m

15 Dans un flacon contenant le lyophilisat d'étain-pyrophosphate (Sn: 0,048mg- Pyrophosphate 1,16mg) on ajoute 1mg de fragments d'anticorps 33B3.1Fab' à 1,2mg/ml (en tampon phosphate 0,1 M pH 6,0 - EDTA 5 mM). Le volume est complété à 1ml avec NaCl 9%. Le flacon est agité, puis le TcO_4^- est ajouté (1 à
20 2 mCi). On laisse en contact 1 heure à température ambiante.

EXEMPLE 4

MARQUAGE DE FRAGMENTS Fab' et F(ab'), de l'anticorps 33B3.1 avec l'INDIUM111

25 A 20mg de fragments $F(ab')_2$ ou $F(ab')$ d'anticorps 33-B-3.1 en solution dans du bicarbonate de sodium 0,1 M à la concentration de 5.10 mg/ml est additionné de l'anhydride bicyclique de DTPA solubilisé dans du DMSO anhydride dans un rapport molaire anhydride
30 DTPA/Anticorps de 5,0 ; la solution est agitée 15 minutes à température ambiante.

Le DTPA non couplé aux anticorps est éliminé par filtration sur gel en utilisant une colonne de séphacryl HR200 (1cm x 30cm) éluée en NaCl 0,15 M. Le
35 nombre moyen de DTPA couplé par anticorps est de 2,0.

29

Pour le radiomarquage au chlorure d'indium, les
an icorps couplés au DTFA sont tamponnés à pH 5,0 en
utilisant un tampon acétate 0,1 M pH 5,0. A cette
solution est ajoutée la quantité d'indium¹¹¹ chlorure
5 désirée. Après agitation 30 minutes à température
ambiante le rendement de marquage est supérieur à 90%.

10

15

20

25

30

35

REVENDEICATIONS

- 1/ Fragments d'anticorps monoclonaux, dirigés contre des récepteurs présents sur les cellules de type leucocytaire infiltrant un greffon, caractérisés par:
- 5 - l'absence de fraction constante (Fc),
- leur capacité à se fixer spécifiquement à l'épitope d'un site antigénique d'un récepteur des cellules leucocytaires infiltrant le greffon lors d'un rejet de greffe.
- 10 2/ Fragments d'anticorps selon la revendication 1, constitués par le fragment idiotypique d'un anticorps, ledit fragment idiotypique possédant un site anticorps spécifique d'un épitope d'un site antigénique d'un récepteur humain déterminé, accessible au niveau d'un greffon chez un patient présentant un rejet de greffe.
- 15 3/ Fragments d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils comprennent au moins un site anticorps présentant une affinité avec la chaîne TAC du récepteur humain de l'Il-2.
- 20 4/ Fragments d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments F(ab')₂ capables de reconnaître la chaîne TAC du récepteur humain de l'Il-2.
- 25 5/ Fragments d'anticorps, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments F(ab') capables de reconnaître la chaîne TAC du récepteur de l'Il-2.
- 30 6/ Fragments d'anticorps, selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisés en ce qu'il s'agit de fragments F(ab) capables de reconnaître la chaîne TAC du récepteur de l'Il-2.
- 35 7/ Fragments d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisés en ce qu'ils sont marqués avec une substance physiologiquement

acceptable, capable de donner un signal mesurable à l'extérieur du corps humain, notamment au moyen d'un appareil RMN ou d'un appareil de comptage de la radioactivité.

5 8/ Fragments d'anticorps selon la revendication 7, caractérisés en ce qu'ils sont marqués avec une substance physiologiquement acceptable, radioactive telle que le technetium99m.

10 9/ Fragments d'anticorps selon la revendication 7, caractérisés en ce qu'ils sont marqués avec une substance physiologiquement acceptable radioactive telle que l'iode131, l'iode125 ou l'indium111.

15 10/ Fragments d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisés en ce qu'il s'agit des fragments de l'anticorps 33B3.1.

20 11/ Composition caractérisée en ce qu'elle a la capacité d'induire la formation de complexes du type antigène-anticorps, chez un patient présentant des leucocytes activés pouvant marquer un risque de rejet de greffe en ce qu'elle est dépourvue de cette capacité chez un patient ayant subi une greffe non rejetée et, en ce qu'elle comprend des fragments d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, pris isolément ou en mélange.

25 12/ Composition selon la revendication 11, capable d'induire la formation de complexes du type antigène-anticorps en présence de leucocytes activés du receveur, porteurs de chaînes TAC du récepteur humain de l'Il-2.

30 13/ Réactif dépourvu de toxicité pour l'homme pour la mise en évidence de la présence de leucocytes activés, chez un patient susceptible de présenter un rejet de greffe, caractérisé en ce qu'il comprend des fragments d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 ou une composition selon la revendication 12,

35

dont les fragments sont marqués par une substance compatible avec l'administration chez l'homme, capable de donner un signal mesurable à l'extérieur du corps humain, notamment au moyen d'un appareil de comptage de la radioactivité.

14/ Méthode d'exploration non sanglante, applicable chez l'homme ayant subi une greffe, pour rechercher la présence de leucocytes activés, cette présence étant susceptible d'être ultérieurement corrélée avec un rejet de greffe, comprenant la détermination de la présence de leucocytes activés chez un sujet greffé au moyen d'un support extérieur au corps du sujet, le sujet ayant reçu au préalable des fragments d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 7 à 10 préalablement marqués si besoin, ou de la composition selon la revendication 10 ou 11, dont les fragments ont préalablement été marqués, ou un réactif selon la revendication 13, caractérisé en ce que les fragments d'anticorps, cette composition ou ce réactif sont administrés en quantité suffisante pour permettre une réaction avec la chaîne TAC du récepteur de l'I1-2, lesdits fragments étant marqués avec une substance physiologiquement acceptable, capable de donner un signal mesurable à l'extérieur du corps humain, notamment au moyen d'un appareil de comptage de la radioactivité,

15/ Procédé d'obtention de fragments d'anticorps monoclonaux selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 10, comprenant les étapes suivantes :

- purification d'anticorps monoclonaux dont on souhaite obtenir lesdits fragments,
- digestion par une ou plusieurs enzymes protéolytiques déterminées, choisies en fonction de la nature des fragments d'anticorps recherchés, dans des

conditions autorisant la coupure desdits fragments du reste des anticorps,

- isolement et récupération des fragments d'anticorps obtenus.

5 16/ Procédé d'obtention de fragments d'anticorps monoclonaux selon la revendication 15, caractérisé en ce que la digestion est effectuée en présence de pepsine pour préparer des fragments d'anticorps F(ab')₂, en présence de papaine pour préparer des
10 fragments F(ab).

17/ Kit pour l'exploration chez un patient ayant subi une greffe, de la présence de leucocytes activés, caractérisé en ce qu'il comprend:

15 - des fragments d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 10,

- un marqueur physiologiquement acceptable, capable de donner un signal mesurable à l'extérieur du corps humain, notamment au moyen d'un appareil de comptage de la radioactivité,

20 - le cas échéant un réactif autorisant la liaison entre le fragment d'anticorps et le marqueur, ou stabilisant cette liaison.

18/ Procédé pour le marquage de fragments d'anticorps selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, par
25 une substance radioactive choisie, comprenant les étapes suivantes :

- mise en contact des fragments d'anticorps que l'on veut marquer, avec un réactif capable de former un complexe stable avec le marqueur et susceptible d'être
30 couplé aux fragments d'anticorps, dans des conditions permet tant ce couplage et,

- complexation des fragments ainsi couplés avec le marqueur, ou en variante,

34

- complexation dudit réactif avec le marqueur puis couplage dudit réactif complexé avec les fragments d'anticorps.

5

10

15

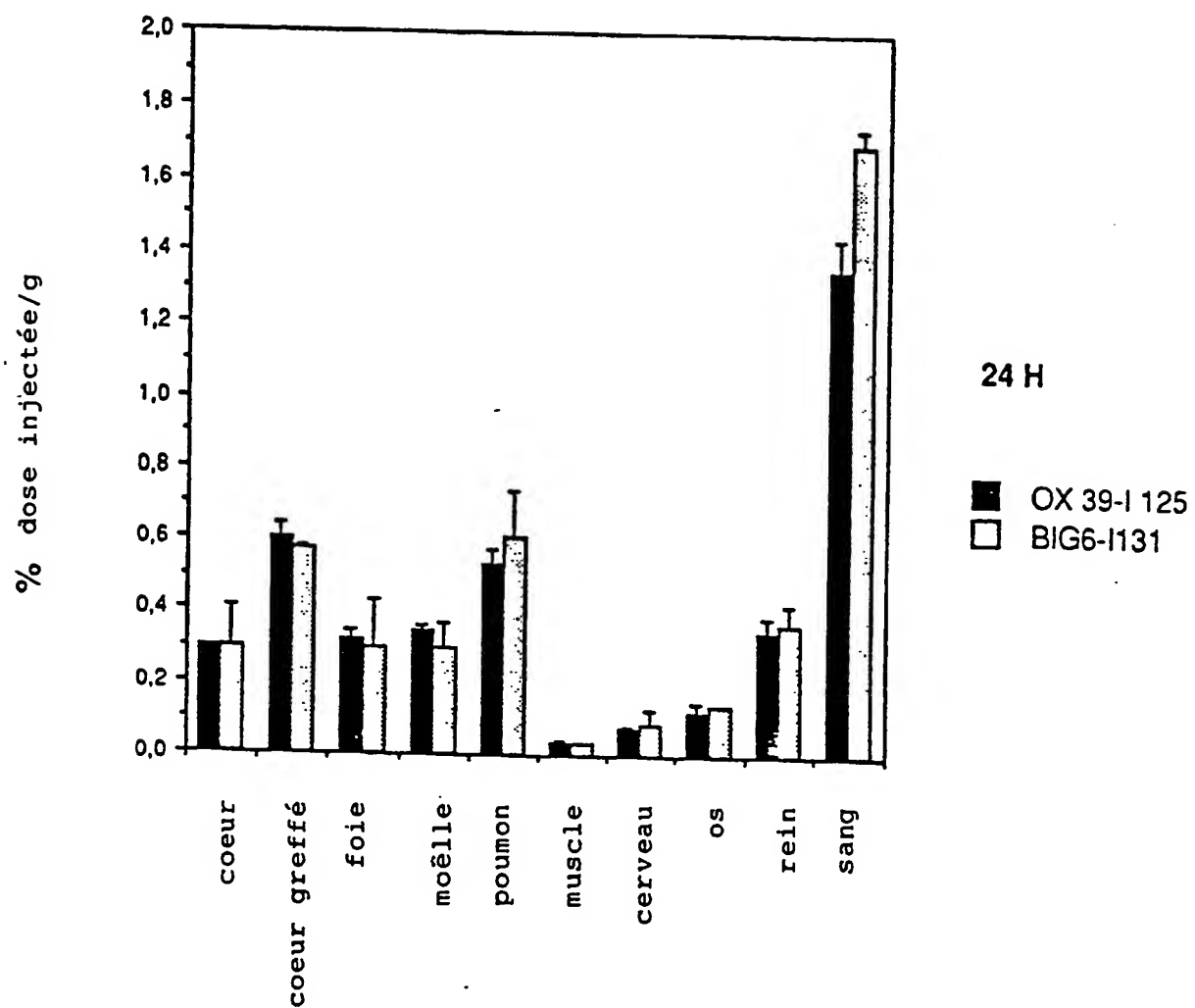
20

25

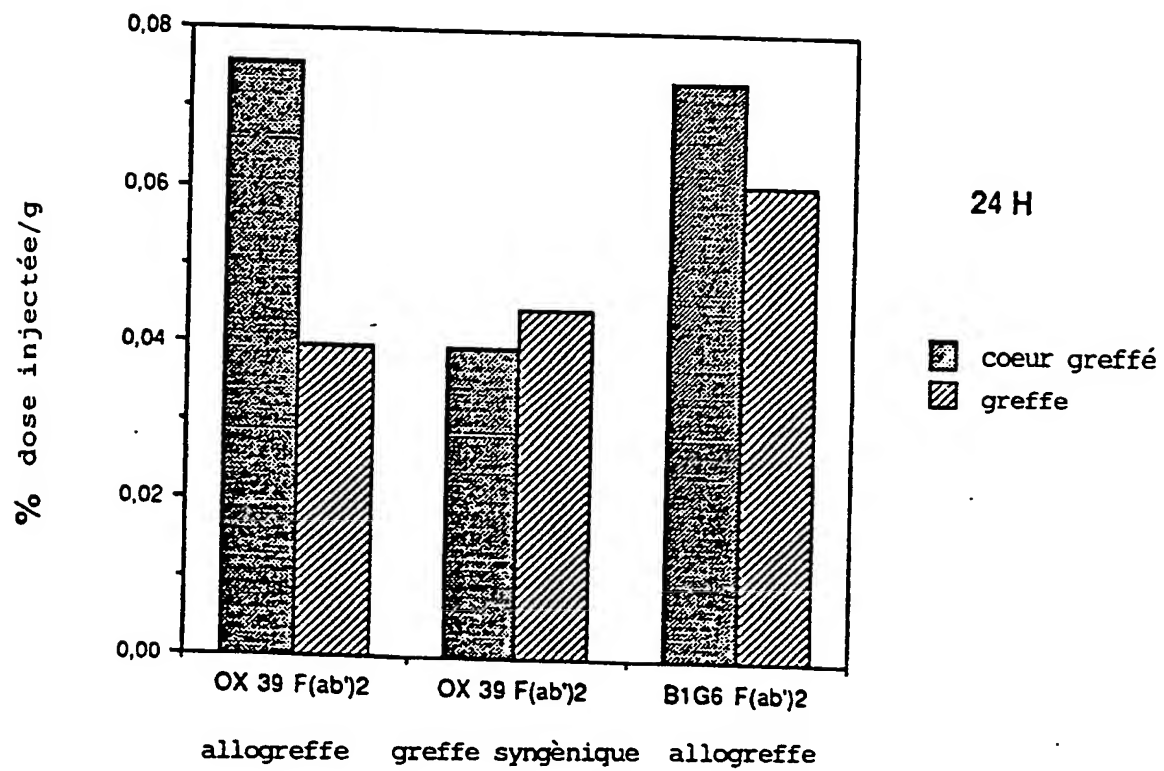
30

35

1/5

Figure 1

2 / 5

Figure 2

3/5

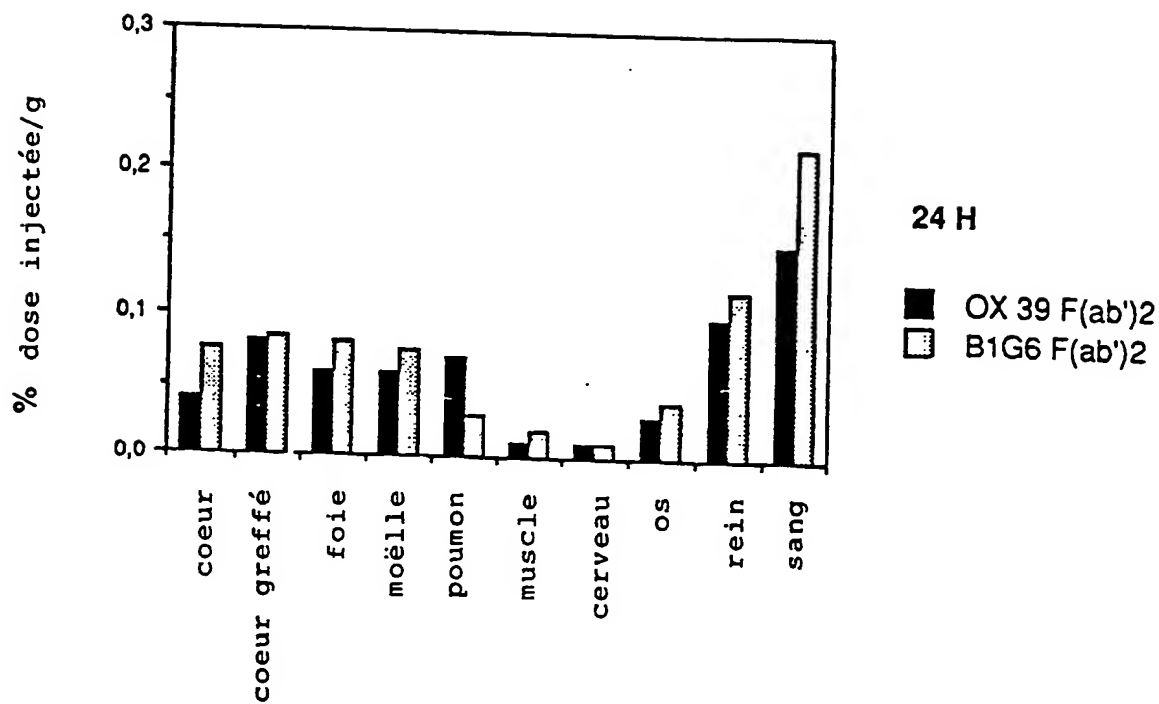
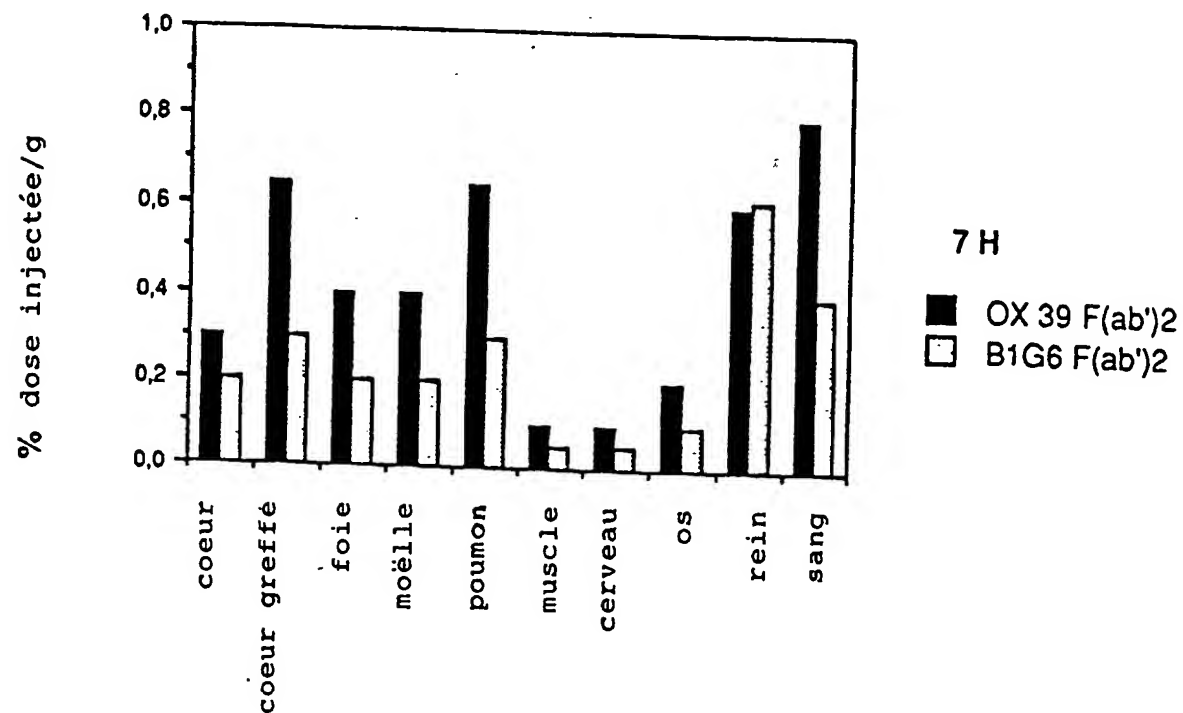


Figure 3

GAMMASCINTIGRAPHIE

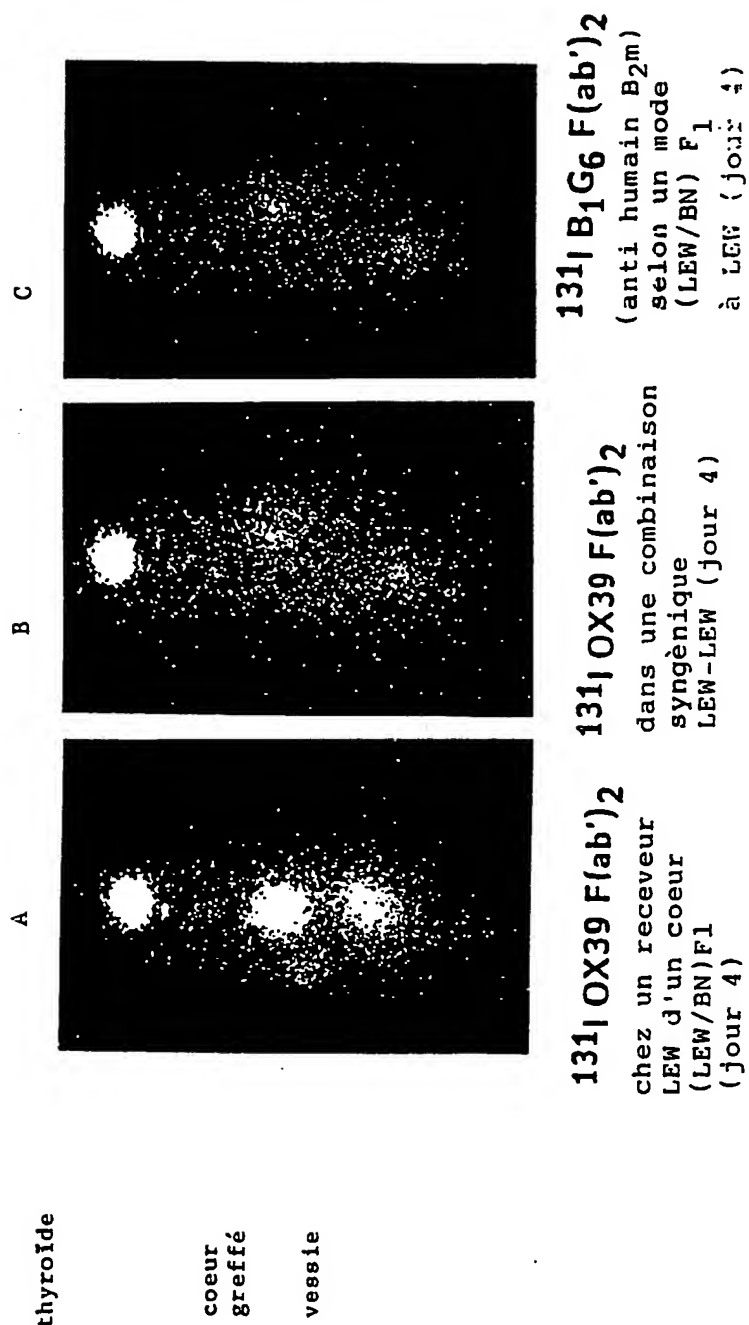


Figure 4

5/5

rapport greffon cardiaque/tissu du receveur

	7 H		24 H	
	RAT 1	RAT 2	RAT 3	RAT 4
	OX39 F(ab') ₂	B1G6 F(ab') ₂	OX39 F(ab') ₂	B1G6 F(ab') ₂
coeur greffe/coeur	2.10	1.50	2.28	1.13
coeur greffe/foie	1.57	1.50	1.33	1.14
coeur greffe/moëlle	1.61	1.49	1.33	1.20
coeur greffe/poumon	1.00	1.00	1.14	2.83
coeur greffe/muscle	12.60	6.00	8.00	3.40
coeur greffe/cerveau	12.58	6.00	8.00	5.66
coeur greffe/os	6.30	3.00	2.66	2.12
coeur greffe/rein	1.03	0.47	0.80	0.68
coeur greffe/sang	0.78	0.75	0.53	0.37

Figure 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR90/00517

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="margin-left: 40px;">IPC⁵: C12P 21/08</div>																							
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 5px;"> <tr> <th style="width: 25%; padding: 5px;">Classification System</th> <th style="padding: 5px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">IPC⁵</td> <td style="text-align: center; padding: 10px;">C12P</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; margin-top: 10px; font-size: small;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	IPC ⁵	C12P																	
Classification System	Classification Symbols																						
IPC ⁵	C12P																						
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 60%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">Transplant International, Volume 1, 1988, Springer-Verlag, Y. Jacques et al.: "A study on OX39, a murine anti-rat interleukin 2 receptor antibody. A report on receptor binding and effects on allograft survival", pages 58-63 see page 58, abstract</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-13,15-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">WO, A, 89/09622 (PROTEIN DESIGN LABS) 19 October 1989, see page 3, line 22 - page 4, line 9</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-13,15-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0241811 (BAYER) 21 October 1987 see page 14, line 1 - page 5, line 9</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-13,15-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">EP, A, 0296082 (IMMUNOTECH) 21 December 1988 see page 8, line 61 - page 9, line 20</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-13,15-18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">L.B. Schook: "Monoclonal antibody production techniques and applications". 1987, Marcel Dekker, (New York & Basel)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1-13,15-18</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: right; padding: 5px;">./.</td> </tr> </table> <div style="margin-top: 10px; font-size: x-small;"> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p> </div> </div> </div>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	Y	Transplant International, Volume 1, 1988, Springer-Verlag, Y. Jacques et al.: "A study on OX39, a murine anti-rat interleukin 2 receptor antibody. A report on receptor binding and effects on allograft survival", pages 58-63 see page 58, abstract	1-13,15-18	Y	WO, A, 89/09622 (PROTEIN DESIGN LABS) 19 October 1989, see page 3, line 22 - page 4, line 9	1-13,15-18	Y	EP, A, 0241811 (BAYER) 21 October 1987 see page 14, line 1 - page 5, line 9	1-13,15-18	Y	EP, A, 0296082 (IMMUNOTECH) 21 December 1988 see page 8, line 61 - page 9, line 20	1-13,15-18	Y	L.B. Schook: "Monoclonal antibody production techniques and applications". 1987, Marcel Dekker, (New York & Basel)	1-13,15-18	./.		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³																					
Y	Transplant International, Volume 1, 1988, Springer-Verlag, Y. Jacques et al.: "A study on OX39, a murine anti-rat interleukin 2 receptor antibody. A report on receptor binding and effects on allograft survival", pages 58-63 see page 58, abstract	1-13,15-18																					
Y	WO, A, 89/09622 (PROTEIN DESIGN LABS) 19 October 1989, see page 3, line 22 - page 4, line 9	1-13,15-18																					
Y	EP, A, 0241811 (BAYER) 21 October 1987 see page 14, line 1 - page 5, line 9	1-13,15-18																					
Y	EP, A, 0296082 (IMMUNOTECH) 21 December 1988 see page 8, line 61 - page 9, line 20	1-13,15-18																					
Y	L.B. Schook: "Monoclonal antibody production techniques and applications". 1987, Marcel Dekker, (New York & Basel)	1-13,15-18																					
./.																							
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="margin-left: 40px;">4 October 1990 (04.10.90)</div> </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="margin-left: 40px;">6 November 1990 (06.11.90)</div> </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> International Searching Authority <div style="margin-left: 40px;">European Patent Office</div> </td> <td style="padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="margin-left: 40px;">4 October 1990 (04.10.90)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="margin-left: 40px;">6 November 1990 (06.11.90)</div>	International Searching Authority <div style="margin-left: 40px;">European Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer																	
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="margin-left: 40px;">4 October 1990 (04.10.90)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="margin-left: 40px;">6 November 1990 (06.11.90)</div>																						
International Searching Authority <div style="margin-left: 40px;">European Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer																						

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

M. Mage et al.: "Preparation of fab and f (ab')₂ fragments from monoclonal antibodies",
pages 79-97
see the whole article

V. ☐ OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:

1. ☒ Claim numbers 14, because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

see PCT rule 39.1 (iv) :
methods for treatment of the human or animal body by surgery or
therapy, as well as diagnostic methods.

2. ☐ Claim numbers _____, because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claim numbers _____, because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. ☐ OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This international Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.
2. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:
3. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:
4. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9000517
SA 38998

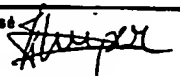
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 26/10/90
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A- 8909622	19-10-89	AU-A- 3544589 EP-A- 0362371	03-11-89 11-04-90
EP-A- 0241811	21-10-87	GB-A, B 2188941 JP-A- 63012297	14-10-87 19-01-88
EP-A- 0296082	21-12-88	FR-A- 2616330 WO-A- 8809671 JP-T- 1503540	16-12-88 15-12-88 30-11-89

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale N°

PCT/FR 90/00517

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) *		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB ⁵ : C 12 P 21/08		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTÉ		
Documentation minimale consultée *		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB ⁵	C 12 P	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté *		
III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie *	Identification des documents cités, ¹¹ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹²	N° des revendications visées ¹³
Y	Transplant International, volume 1, 1988, Springer-Verlag, Y. Jacques et al.: "A study on OX39, a murine anti-rat interleukin 2 receptor antibody. A report on receptor binding and effects on allograft survival", pages 58-63 voir page 58, résumé	1-13,15-18
Y	WO, A, 89/09622 (PROTEIN DESIGN LABS) 19 octobre 1989 voir page 3, ligne 22 - page 4, ligne 9	1-13,15-18
Y	EP, A, 0241811 (BAYER) 21 octobre 1987 voir page 14, ligne 1 - page 5, ligne 9	1-13,15-18
Y	EP, A, 0296082 (IMMUNOTECH) 21 décembre 1988 voir page 8, ligne 61 - page 9, ligne 20	1-13,15-18
	-- ./.	
<p>* Catégories spéciales de documents cités: ¹¹</p> <p>« A » document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>« E » document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>« L » document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>« O » document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>« P » document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>« T » document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>« X » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>« Y » document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>« & » document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
4 octobre 1990	06. 11. 90	
Administration chargée de la recherche internationale OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	Signature du fonctionnaire autorisé Mme N. KUIPER 	

SUIITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE

Y	L.B. Schook: "Monoclonal antibody production techniques and applications". 1987, Marcel Dekker, (New York & Basel) M. Mage et al.: "Preparation of fab and f(ab') ₂ fragments from monoclonal antibodies", pages 79-97 voir l'article en entier -----	1-13,15-18
---	---	------------

V. OBSERVATIONS LORSQU'IL A ÉTÉ ESTIMÉ QUE CERTAINES REVENDICATIONS NE POUVAIENT PAS FAIRE L'OBJET D'UNE RECHERCHE

Selon l'article 17.2) a) certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications numéros 1-4 se rapportent à un objet à l'égard duquel la présente administration n'a pas l'obligation de procéder à la recherche, à savoir:

Voir la Règle PCT 39.1(iv):

méthodes de traitement du corps humain ou animal par la chirurgie ou la thérapie, ainsi que méthodes de diagnostic.

2. ☐ Les revendications numéros..... se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas les conditions prescrites dans une mesure telle qu'une recherche significative ne peut être effectuée, précisément:

3. ☐ Les revendications numéros..... sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément à la deuxième et à la troisième phrases de la règle 6.4.a) du PCT.

VI. OBSERVATIONS LORSQU'IL Y A ABSENCE D'UNITÉ DE L'INVENTION

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la présente demande internationale, c'est-à-dire:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles demandées ont été payées dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre toutes les revendications de la demande internationale pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme seulement une partie des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais, le présent rapport de recherche internationale couvre seulement celles des revendications de la demande pour lesquelles les taxes ont été payées, c'est-à-dire les revendications:
3. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale est limité à l'invention mentionnée en premier dans les revendications; elle est couverte par les revendications numéros:
4. ☐ Étant donné que toutes les revendications susceptibles de faire l'objet d'une recherche le pouvaient sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration chargée de la recherche internationale n'a sollicité le paiement d'aucune taxe additionnelle.

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles de recherche étaient accompagnées d'une réserve du déposant.
- ☐ Aucune réserve n'a été faite lors du paiement des taxes additionnelles de recherche.

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9000517
SA 38998

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26/10/90

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A- 8909622	19-10-89	AU-A- 3544589 EP-A- 0362371	03-11-89 11-04-90
EP-A- 0241811	21-10-87	GB-A,B 2188941 JP-A- 63012297	14-10-87 19-01-88
EP-A- 0296082	21-12-88	FR-A- 2616330 WO-A- 8809671 JP-T- 1503540	16-12-88 15-12-88 30-11-89

EPO FORM P0472

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82